

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

19 AUG 2004

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. August 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/070923 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 5/10**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/01766

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Februar 2003 (20.02.2003)

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 07 436.4 21. Februar 2002 (21.02.2002) DE
102 20 474.8 7. Mai 2002 (07.05.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MACHENS, Hans-Günther [DE/DE]; Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, 81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

A1

WO 03/070923

(54) Title: AGENT FOR INDUCING OR INHIBITING AN ANGIOGENESIS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR INDUKTION ODER INHIBITION EINER ANGIOGENESE

(57) Abstract: The invention relates to an agent for inducing or inhibiting an angiogenesis, to a method for the production thereof and to its use.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese, ein Verfahren zu dessen Herstellung sowie dessen Verwendung.

5

10

Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese.

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese (Blutgefäßneubildung), ein Verfahren 15 zu dessen Herstellung sowie dessen Verwendung.

Ein Grundprinzip allen Lebens ist die Aufrechterhaltung eines intra- und extrazellulären Steady-State-Zustandes sowie eines physiologischen Fließgleichgewichtes. Jegliche Unterbrechung 20 und Störung in der Erhaltung dieses Gleichgewichtes gefährdet und zerstört schließlich das Leben der Zelle. In allen höher entwickelten Organismen spielt der Blutfluß eine zentrale Rolle zur Sicherung der Zellfunktion. Die Versorgung mit Sauerstoff und energiereichen Substraten sowie der Abtransport 25 von Metaboliten muß den sich ständig verändernden Bedingungen angepaßt werden. Physiologische Veränderungen der Gewebedurchblutung, gleich, ob es sich um eine Erhöhung oder Ver- minderung handelt, müssen den veränderten energetischen An- 30forderungen der Zelle äquivalent sein und dürfen auf keinen Fall unterbrochen werden. Geschieht dies dennoch, führt eine solche Veränderung über kurz oder lang zum Zelluntergang.

Eine Möglichkeit des Organismus, dem erhöhten Energiebedarf der Zellen gerecht zu werden, besteht neben der Öffnung zuvor noch von der Durchblutung ausgeschalteten Gefäßen in der Ausbildung neuer mikrozirkulatorischer Bahnen. Dieser letztere 5 Prozess wird dann in Gang gesetzt, wenn keine abrupte Unterbrechung des Steady-State erfolgt, sondern der vermehrte Energiebedarf langsam genug einsetzt, so daß dem Organismus noch Zeit zur Ausbildung neuer Kapillaren verbleibt. Dieser Vorgang wird Angiogenese genannt und erfolgt, wie jede andere 10 Zellteilung im Organismus auch, vom ersten Moment des embryonalen Lebens an bis zum Tode des Gesamtorganismus. Es handelt sich dabei um einen biologischen Mechanismus, bei dem neue Kapillaren gebildet werden durch Aktivierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen aus vorbestehenden Endothel- 15 Perizytenverbänden. Aussprossungen der aktivierten Endothelzellen dringen dabei in das Bindegewebsstroma ein durch eine partielle Desintegration der Basalmembran im Muttergefäß als ersten Schritt. Die Migration der Endothelzelle wird normalerweise richtungsbestimmt durch einen angiogenetischen Stimulus und unterstützt durch eine Proliferation der benachbarten Endothelzellen. Nach Ausbildung eines Lumens und Fusion zweier benachbarter aussprossender Endothelzellen beginnt der 20 Blutfluß durch die neu gebildete Kapillare. Werden die beschriebenen angiogenetischen Prozesse rechtzeitig vom Körper initiiert, so kann eine drohende Ischämie, also eine Mangelversorgung der abhängigen Gewebeanteile des Körpers durch Blut, vermieden werden. In vielen Fällen jedoch ist dieser Mechanismus nicht ausreichend, so dass das ischämisch gefährdeten Gewebe abstirbt (z.B. Herzinfarkt/akute Ischämie oder 25 diabetisches Ulkus/chronische Ischämie). 30

Im Zeitalter der Gentechnologie ergibt sich hier ein völlig neuer therapeutischer Zugang zu diesem Problem, nämlich durch Induktion einer Neovaskularisation mittels Zelltransduktion zur Produktion angiogenetisch wirksamer Faktoren im betroffenen Gewebe.

Überraschenderweise gibt es in der Plastischen Chirurgie bisher nur wenig experimentelle Ansätze, um überhaupt die Möglichkeiten des Gentransfers für diesen Bereich zu nutzen. In den bisher erschienenen Arbeiten zur experimentellen und klinischen Transduktion von Zellen zur Produktion angiogenetisch wirksamer Faktoren war bisher noch keine direkte Relevanz für den Bereich der Plastischen Chirurgie aufgezeigt worden. Dabei dürfte die mögliche therapeutische Bedeutung solcher angiogenetisch wirksamer Substanzen gerade in diesem Bereich der Chirurgie unbestritten sein. Eine gesteuerte Einflußnahme auf die Wundheilung und das Überleben von Gewebe durch Gefäßinduktion würde nicht nur direkte klinische Bedeutung haben, sondern auch ein neues wissenschaftliches Feld zum Studium und besseren Verständnis mikrozirkulatorischer Phänomene im Gewebe unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eröffnen.

Andererseits lassen sich durch die Gentechnologie auch anti-angiogenetische Therapieansätze finden, nämlich dann wenn es gilt, die Durchblutung im Gewebe zu reduzieren, ja sogar zu unterbrechen. Das kann jedoch nur der Fall sein, wenn das entstehende Gewebe nicht erwünscht ist, wie im Falle der Bildung benigner und maligner Tumoren. In diesem Fall kann durch antiangiogenetische Maßnahmen die Durchblutung solcher Tumoren derart verschlechtert werden, dass die Tumoren schließlich kleiner werden oder sogar ganz absterben. In der Onkolo-

gie liegen dazu sehr viele therapeutische Ansätze vor, die sich aber von dem hier beschriebenen unterscheiden.

Erfindungsgemäß wird ein Mittel zur Induktion oder Inhibition 5 einer Angiogenese vorgeschlagen, das isogene oder autologe Körperzellen umfaßt, die mindestens ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein exprimieren. Isogene (=syngene) Zellen im Sinne der Erfindung sind genetisch identische Zellen, die zu keiner Immuninkompatibilität nach Retransplantation 10 in einen isogenen Organismus führen. Beim Menschen sind isogene Zellen als artgleiche und genetisch identisch von eineiigen Zwillingen bekannt. Die Transplantationsmedizin geht bei einer isogenen (=isogenetischen) Transplantation von der eher seltenen genetischen Identität von Spender und Empfänger 15 aus, die z.B. ebenfalls bei eineiigen Zwillingen vorliegt. Im Tierreich, insbesondere bei Versuchstieren, wie Mäusen und Ratten, die aus echten Inzuchtstämmen hervorgehen, sind isogene Zellen dagegen häufig. Autologe Zellen sind solche Körperzellen, bei denen Spender und Empfänger ein und 20 derselbe Organismus sind.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung ist in dem erfindungsgemäßen Mittel das mindestens eine angiogenetische Protein 25 unter PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGFbeta (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewählt.

30 Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist in dem erfindungsgemäßen Mittel das mindestens eine antiangiogenetische Protein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth fac-

tor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für VEGFR1 und VEGFR2 ausgewählt.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Herstellung ei-
5 nes erfindungsgemäßen Mittels bereit, bei dem

a) in einem Körper durch Implantation von biologisch iner-
tem Material, z.B. Silastik, die Bildung von isogenen oder
autologen Zellen ausgelöst wird,

10 b) die in Schritt a) gebildeten Zellen aus dem Körper ge-
wonnen werden,

15 c) die in Schritt b) gewonnenen Zellen gentechnisch, z.B.
durch retroviralen, insbesondere adenoviralen, Gentransfer,
so verändert werden, daß sie im Falle einer gewünschten In-
duktion einer Angiogenese mindestens ein angiogenetisches
Protein oder im Falle einer gewünschten Inhibition einer An-
20 giogenese mindestens ein antiangiogenetisches Protein expri-
mieren.

Ein biologisch inertes oder metabolisch inertes Material ist
20 ein Material, welches nicht an den Stoffwechselprozessen des
Körpers teilnimmt, aber trotzdem eine zelluläre Reaktion aus-
lösen kann (Ansammlung von Fibroblasten). Wenn ein solches
Material (z.B. Silastik) implantiert wird, dann bildet sich
25 innerhalb von wenigen Tagen (5-7) eine bindegewebige Kapsel
um das Implantat, welche die gewünschten Fibroblasten ent-
hält. Diese Kapsel mitsamt Fibroblasten kann man entnehmen
und nach Trypsinisierung des Materials die Fibroblasten iso-
lieren und kultivieren. Diese Fibroblasten können isogen
sein. Das heißt, sie stammen von einem isogenen Spendertier,
30 welches die gleichen genetischen Eigenschaften hat wie die
Tiere, in die dann später die genetisch modifizierten isoge-
nen Fibroblasten retransplantiert werden. Die Alternative

(und das ist klinisch am sinnvollsten) besteht darin, dass man die Fibroblasten aus dem Patienten gewinnt, dem man später diese Zellen nach genetischer Modifikation auch wieder retransplantieren möchte. In diesem Falle würde es sich um 5 autologe Zellen handeln, also Zellen, bei dem Spender und Empfänger identisch sind.

Nach einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens exprimieren die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter unter 10 PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGFbeta (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewähltes angiogenetisches Protein.

15

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens exprimieren die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für 20 VEGFR1 und VEGFR2 ausgewähltes antiangiogenetisches Protein.

25

Die Erfindung gibt ferner die Verwendung eines erfindungsgemäßen Mittels oder eines nach einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Mittels zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese an.

30

Nach einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung wird ein erfindungsgemäßes Mittel oder ein nach einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestelltes Mittel in isogenes oder autologes Gewebe des Körpers eingeführt, in dem eine Angiogenese induziert oder inhibiert werden soll.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung des Mittels umfassend isogene oder autologe Körperzellen, die mindestens ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein exprimieren, zur Herstellung eines Arzneimittels zur
5 Induktion oder Inhibition einer Angiogenese.

Das Arzneimittel kann an verschiedene Darreichungsformen angepasst sein und weitere Zusatz- und/oder Hilfsstoffe wie beispielsweise Arzneistoffträger, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und/oder Farbstoffe enthalten. Beispielhafte Darreichungsformen betreffen Transplantate, Implantate, Infusionslösungen, Salben, Tropfen und/oder Tabletten, wobei Implantate, Transplantate und Infusionslösungen bevorzugt sind.
10

15 Darüber hinaus umfasst die Erfindung eine Zelle bzw. Zellen, insbesondere Fibroblasten, die gentechnisch derart modifiziert sind, dass sie mindestens ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein exprimieren. Diese Zellen eignen sich zur Herstellung von Transplantaten und Implantaten zur
20 Einbringung in den menschlichen oder tierischen Körper, um eine Angiogenese zu induzieren oder zu inhibieren. Mit Hilfe des Transplantates oder Implantates lässt sich gegenüber herkömmlichen Gaben von angiogenetischen bzw. antiangiogenetischen Proteinen ein gesteigerter Therapieerfolg in Form von
25 gesteigerter bzw. verminderter Angiogenese beobachten.

Ferner umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten, bei dem eine Angiogenese induziert oder inhibiert werden soll, wobei das Verfahren den
30 Schritt umfasst: (a) Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge des Mittels zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese, das isogene oder autologe Körperzellen umfasst,

die mindestens ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein exprimieren.

Die therapeutisch wirksame Menge des Mittels kann mehrmals, 5 beispielsweise über mehrere Behandlungszyklen, mit Pausen zwischen den Anwendungen, verabreicht werden.

Das erfindungsgemäße Mittel eignet sich z.B. bei Diabetikern zur Behandlung von schlecht heilendem Ulkus oder zur Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlußkrankheit (pAVK) durch Vermehrung der Blutgefäßneubildung. In akuten Fällen von Mangeldurchblutung (z.B. beim Herzinfarkt) kann das Mittel ebenfalls eingesetzt werden. Zur Behandlung von Tumoren, besonders auch solchen, die auf einer Entartung 15 der blutgefäßbildenden Zellen beruhen, kann das erfindungsgemäße Mittel antiangiogenetisch eingesetzt werden. Weiterhin ist das antiangiogenetische Mittel überall dort einsetzbar, wo eine lokale antiangiogenetische Behandlung von Tumoren sinnvoll und möglich erscheint (z.B. noch nicht metastasierte 20 Malignome).

Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung des Anspruchswortlauts unter Bezugnahme auf konkrete Ausführungsformen und Arbeitsbeispiele detaillierter beschrieben.

25 In einer Reihe von experimentellen Untersuchungen hat der Erfinder festgestellt, daß nach beispielsweise retroviralem oder adenoviralem Gentransfer einer Nukleinsäure, die für ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein kodiert, 30 in isogene Fibroblasten der Ratte (GMFB) diese in vitro eine stabile Integration zum Beispiel des humanen Gens PDGF-A aufweisen. In vitro konnte dadurch eine bis zu 560-fach höhere

Konzentration von zum Beispiel PDGF-AA, verglichen mit nicht genetisch modifizierten Fibroblasten (NMFB) erreicht werden.

Weiterhin konnte erstmals in vivo gezeigt werden, daß GMFB wie auch NMFB nach Transplantation in einem epigastrischen Insellappenmodell der Ratte nachweisbar vital bleiben. Das durch GMFB produzierte PDGF-AA führte dann unter ischämischen Bedingungen in dem beschriebenen Modell zu einer sich innerhalb von 7 Tagen nach Transplantation manifestierenden Angiogenese und damit zu einer signifikant höheren Überlebensrate von ischämisch gefährdetem Lappengewebe.

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, daß die beschriebenen angiogenetischen Effekte von PDGF-AA ischämieabhängig sind und unter Normalbedingungen im nicht ischämisch gefährdeten Gewebe nicht auszulösen sind. Weitere Untersuchungen, in denen auf gentechnologische Zellmanipulationen verzichtet und statt dessen einmalige Bolusgaben von zum Beispiel VEGF165 sowie des selektiven VEGF165-Antagonisten sFLT-1 D1-D6 verwendet wurden, erbrachten zwar angiogenetische Effekte, die jedoch weit hinter den Ergebnissen der PDGF-AA-Effekte durch retroviral modifizierte Fibroblasten zurückblieben. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß der in vom im Labor des Erfinders produzierte Antagonist sFLT-1 D1-D6 klinisch eine inhibitorische Wirkung auf VEGF165 hat.

Die bisher gefundenen Ergebnisse zeigen, daß in ischämischen Zuständen eine funktionelle Angiogenese am ehesten durch eine temporäre Genexpression in vivo sinnvoll ist, wobei zunächst eine Induktion von VEGF165 und kombiniert mit sFLT-1 D1-D6 als selektiver Antagonist zur Negativkontrolle erfolgen soll. Die nur zeitweilige Genexpression in vivo kann beispielsweise

durch die Wahl geeigneter induzierbarer oder reprimierbarer Promotoren im Expressionskonstrukt erreicht werden. Der Vorteil solcher Promotoren liegt in ihrer Regulierbarkeit, so dass der Zeitpunkt wann das angiogenetische bzw. antiangiogenetische Protein exprimiert wird, von außen durch die entsprechende Gabe von den Promotor induzierenden oder reprimierenden Substanzen individuell gesteuert werden kann.

Material und MethodenZellkulturen und deren genetische Modifikation

5 Fibroblasten: aus autologen Inbred-Rattenstämmen (weibliche Lewis-CRL-Ratten, Gewicht 200-215 Gramm; Charles River Laboratorien) gewonnene Fibroblastenkulturen

10 Virusproduzierende Zelllinie: amphotrophe psi-CRIP-Verpackungszelllinie, die von murinen NIH-3T3-Fibroblasten abstammt, welche die retroviralen Genprodukte gag, pol und env exprimieren (R.Mulligan, Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, Mass. sowie W. Lindenmaier, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung/Baunschweig). Transduktion der psi-CRIP Verpackungszelllinie mit MFG Plasmid DNS, Klonierung derselben und Screening der Zelllinie, welche die höchsten Virionentiter produziert (J.R.Morgan, Shriners Burns Research Laboratories, Cambridge, Mass. sowie W. Lindenmaier, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung/Baunschweig)

15

20 Fibroblasten-Zellkulturmedium: Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM, hochprozentige Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat 110 mg/L von Gibco BRL/ USA), FBS (fetal bovine serum = fetales Rinderkalbserum) 10 % (Fa. HtClone/ USA), Penicillin-Streptomycin 100IU/ml-100microl/ml (Fa. Boehringer), BCS (bovine calf serum = bovines Rinderkalbserum) 10 % (Fa. 25 HtClone/USA)

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) bestehend aus 138 mM NaCl, 2,7 M KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, sterilisiert über einen 0,45-Mikrometer-Filter

EDTA - Lösung (genannt 'Versene') (= (ethylenedinitriol)-tetraacetic acid disodium Salz, Fa. Boehringer): 5 mM in PBS aufgelöst und über einen 0,45-Mikrometer-Filter sterilisiert

5 Trypsinlösung (Trypsin 1-300, Fa. ICN Biochemicals), bestehend aus 0,1 % D-Dextrose (w/v) und Trypsin 0,1 % (w/v) in PBS bei einem pH von 7,5

10 Aufbewahrungsflasche für Trypsin (25 ml, Fa. Wheaton Scientific)

Polybrene (Fa. Sigma/USA)

15 DMSO (Dimethyl-Sulphoxid; Fa Sigma-Aldrich; Irvine/England)

15 Versuchstiere und operatives Vorgehen

20 400 autologe Lewis-Ratten (Inbred-Stämme; weiblich) aus den Charles River Laboratories (Pittsfield NH/USA). Alle Tierver-
suche erfolgen streng nach den hierfür vorgesehenen Protokollarien des Universitätsklinikums Lübeck.

25 Silastikfolie (0,0127 mm Durchmesser; PharmElast, SF Medical Hudson MA/USA)

25 Halskragen für Ratten als Autokannibalismusschutz (Fa. Kent Scientific/Litchfield, CT/USA)

Operationsinstrumentarium incl. Mikrobesteck

30 Aethyläther (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA)

Ketamin (Ketanest 100 mg/ml; Fort Dodge Laboratories, Iowa/USA)

Xylazin (Rampun 20 mg/ml; Bayer Corporation, Kansas/USA).

5

Betadine

Immunoassays und ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (R&D Systems, Minneapolis/USA).

ELISA für VEGF-165, sFLT-1, PDGF-B und bFGF aus dem Labor Dr. Weich/GBFBraunschweig

15 Histologiefärbungen und Immunhistochemie

Haematoxylin-Eosin

Anti-Human von Willebrand Factor, IgG Fraction (Fa. Sigma, St.Louis, MO/USA)

FITC Conjugate, Anti-IgG (Fa. Sigma, St.Louis, MO/USA)

20

VEGF165-mRNS-Analyse

Die Methoden zur VEGF-mRNA - Quantifizierung sind ansich bekannt (kompetitive RT-PCR, Northern blot).

25 Fibroblastenproduktion

Autologe Rattenfibroblasten werden in 5 Tieren des oben genannten Rattenstammes gezüchtet als spätere Trägerzellen zur Expression des gewünschten Gen. Die Tiere werden hierfür anästhesiert durch intraperitoneale Injektion z.B. einer Kombination aus 0,05 mg/gm Ketamin (Ketanest 100 mg/ml; Fort Dodge Laboratories, Iowa/USA) und 0,0013 mg/gm Xylazin (Ram-

pun 20 mg/ml; Bayer Corporation, Kansas/USA). Die spontan atmenden Tiere werden vom Xyphoid bis zur Leistenregion rasiert und auf einen Operationstisch plaziert.

5 Die Körpertemperatur wird während eines jeden Experimentes mittels eines digitalen Rektalthermometers gemessen und über eine Wärmematte bei 36 - 37 Grad Celsius konstant gehalten. Nach sterilem Abwaschen des Operationsgebietes erfolgt vom Xyphoid entlang der Linea alba nach caudal hin ein Schnitt 10 mit dem 10er Skalpell, wobei nur die Haut und das subcutane Fettgewebe durchtrennt und die Faszie der Rektusmuskulatur belassen wird, um anschließend unter sorgfältiger Schonung der epigastrischen Hautgefäße nach beidseits lateral hin eine ungefähr 4 x 5 cm große Wundtasche zu schaffen.

15 In diese Tasche hinein wird eine ebenso große Silastikmembran (Silastik ist nur ein Beispiel für ein geeignetes Material, das nach der Implantation die Bildung von isogenen Fibroblasten bewirkt und sonst keine weiteren Nebenwirkungen hat) 20 (PharmElast; SF Medical) plaziert und durch subcutane Ecknähte (6-0 Ethilon) fixiert. Diese Membran hat eine Dicke von z.B. 0,0127 mm, ist besonders weich, äußerst flexibel und wird steril verpackt geliefert. Vor Implantation der Folie wird diese sterilgewaschen. Nach Fixieren der Folie in situ 25 erfolgt der Wundverschluß durch eine intracutane laufende 6-0 Ethilonnaht mit Versenken der Eckknoten.

Die Tiere werden über 7 Tage täglich beobachtet bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung, um frühzeitig Probleme in der 30 Wundheilung aufdecken zu können. Nach diesem Zeitraum werden die Tiere wie zuvor beschrieben betäubt und die Silastikmembran, die als Fremdkörper die lokale Fibroblastenprodukti-

on anregen sollte, mitsamt dem sich darum gebildeten Narben-gewebe entfernt. Die Tiere werden eingeschläfert mittels ei-ner intraperitonealen Überdosis des genannten Anästhesiegemi-sches.

5

Fibroblastenseparation und -züchtung

Das operativ gewonnene Fibroblastenkonglomerat wird sofort in DMEM bei 4 Grad Celsius bewahrt und einer möglichst raschen Verarbeitung unterzogen. Das Material wird unter sterilen Be-10 dingungen von der Silastikmembran abgelöst. Sämtliche Arbei-ten mit der Fibroblastenkultur finden in einem Labor gentech-nische Sicherheitsstufe 2 statt mit Luftabzug an jedem steri-len Arbeitsplatz.

15 Das Material wird nun einer ausgiebigen Waschung unterzogen in insgesamt 10 Plastikbehältern mit jeweils 10 ml PBS (phos-20 hatgepuffertes Kochsalz 0,9 %). Jeder Behälter kann steril verschlossen werden, so daß das Fibrozytenkonglomerat 10 x 60 Sekunden lang kräftig im PBS geschüttelt werden kann. Nach zweimaligem Waschen wird das Gewebe noch einmal entnommen, um letzte Bindegewebsreste und Silasikanteile, die sich demar-25 kiert haben, unter sterilen Kautelen zu entfernen.

30 Danach wird das Material in eine sterile 25 ml Monovette ge-geben und mit 5 ml Trypsin und 5 ml EDTA über 5 Minuten enzy-matisch behandelt, um die Fibroblasten aus dem Kollagen-verband zu lösen. Die Zellen werden durch sterile Gaze gefil-tiert und anschließend in DMEM mit 20 %igem FBS gewaschen, um die Trypsinaktivität zu neutralisieren. Die so gewonnene Sus-pension wird bei 800 U/min über 5 Minuten zentrifugiert. Die Fibroblasten setzen sich am Boden ab und werden mit 10 ml DMEM aufgemischt.

20 Mikroliter der Suspension werden in einem Zellzähler (Hämocytometer) ausgezählt und der Überstand anschließend abpipettiert. Die Zellen werden dann in Brutkammern mit 75 cm^2 Bodenfläche mit einer Aussaat von 5×10^4 Zellen/ cm^2 gezüchtet. Die Züchtung erfolgt in einem Medium aus DMEM, versetzt mit 100 Mikrogramm/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin, 3 Mikroliter/ml Amphotericin, 5 % FBS und 10 Mikrogramm/ml Ascorbinsäure, welche täglich zu dem Nährmedium dazugegeben wird. Das Nährmedium selbst wird alle 3 Tage gewechselt, da die Fibroblasten sich durchschnittlich einmal pro 16-18 Stunden teilen und einen entsprechenden Energiemetabolismus haben.

15 Wenn die Fibroblasten nahezu konfluieren, wird eine erneute Zellseparation durchgeführt. Die solchermaßen gewonnenen Zellen können anschließend neu ausgesät werden zur weiteren Züchtung neuer Zellen oder auch asserviert und eingefroren werden. Dies erfolgt durch Zellseparation und anschließende 20 Suspension in DMEM mit 10 % FBS und entsprechendem Antibiotikazusatz. Im Falle einer Asservierung von CRIP - Zellen werden diese allerdings mit BCS-Medium suspensiert. Dem Medium wird als Kryoprotektivum die Substanz DMSO in einem Mischungsverhältnis von 1:10 beigefügt. Pro ml Medium sollten 25 dann zwischen 1×10^6 Zellen enthalten sein. Anschließend werden jeweils 1-2 ml Medium/Container abgefüllt und für 24 Stunden bei - 20 Grad Celsius eingefroren. Am folgenden Tage werden die Container dann in - 80 Grad Celsius tiefgefroren, um wiederum 24 Stunden später in flüssigem Stickstoff bei - 30 196 Grad Celsius zu verbleiben. Durch dieses schrittweise Einfrieren wird die Ausbildung von Eiskristallen in der Suspension mit daraus folgender Zellschädigung vermieden.

Produktion rekombinanter Retro- und Adenoviren und Gentransfer in die Fibroblastenkulturen

Sämtliche gentechnischen Arbeiten werden in den dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der Sicherheitsstufe 1 und 2 nach den entsprechenden gentechnologischen Laborprotokollen durchgeführt und sind von der zuständigen Behörde für gentechnische Sicherheit genehmigt.

Der erste Schritt beim Gentransfer besteht in der Produktion eines rekombinanten Virus, welcher das zu transferierende Gen kodiert. In diesen Experimenten wird eine cDNS, welche das interessierende Protein kodiert, mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert. Die entsprechenden Primer produzieren z.B. einen BspH1-Locus am Translations-Startercodon und z.B. einen BamH1-Locus am Translations-Stopcodon. Das Produkt der PCR kann dann isoliert werden durch Auftrennen des Genproduktes an den genannten Stellen und Insertion des gewonnenen Genes in die Ncol/BamH1 Loci eines viralen Vektors, genannt MFG. Die erfolgreiche Übertragung wird anschließend durch DNS-Sequenzierung überprüft.

Dieser Vektor (MFG-Plasmid DNS) stammt z.B. aus dem murinen Moloney Leukämie-Virus, enthält selbst keine viralen Gene außer denen, die zur Transkription, Verpackung, reversen Transkription, Integration und Expression des viralen Vektors mit dem darin befindlichen modifizierenden Gen notwendig sind. Um nun Virionen produzieren zu können, die diesen Vektor in Zielzellen genetisch verankern können, muß der Vektor in eine spezielle Verpackungszelllinie, welche z.B. von murinen 3T3 Fibroblasten stammt, integriert werden. Die Transduktion des Vektors in die entsprechende Verpackungszelllinie wird durch

wird durch die Zugabe von Calciumphosphat erleichtert, da dadurch die Zellmembranen des Verpackungszelllinien temporär porös werden und dem viralen Vektor leichter Zugang zur Zelle verschaffen. Diese Verpackungszelllinie (Psi- CRI) wurde speziell produziert, um die retroviralen Proteine pol, env und gag zu liefern, welche ihrerseits Virionen herstellen können, die den Vektor mit dem darin befindlichen modifizierenden Gen kodieren und übertragen. Die Verpackungszelllinie selbst kann keine Viren herstellen, die 'wild type' Replikanten entsprechen und damit virulent sind. Stattdessen transkribiert sie die DNS des rekombinanten viralen Vektors in RNS, welche dann in die RNS des Virions integriert wird. Die Psi- CRP-Verpackungszelllinie scheidet dann das Virion, also den rekombinanten Virus mitsamt modifizierendem Gen in das Zellmedium aus. Eine Transfektion der Zielzellen gelingt effektiv bei einer Menge von 1,0 - 10,0 Mio. Virionen/ml Medium. Es wird deshalb jede transfizierte Zelllinie nach der höchsten Titerverproduktion überprüft, um diese dann für den Gentransfer zu selektieren. Für den adenoviralen Gentransfer wird als Cosmidvektorfragment ein padcos46 RESeGFP (39155 bp) verwendet und mit der entsprechenden gewünschten Gensequenz bestückt. Selbstverständlich kann der Vektor so konstruiert werden, daß eine Genexpression nur unter gleichzeitiger Gabe einer weiteren Substanz erfolgt. Damit ist eine zeitlich gesteuerte Expression möglich. Geeignete Vektoren mit sog. "on/off"-Genfunktionen sind im Stand der Technik bekannt.

Für die Transduktion werden die gewonnenen Fibroblasten in Brutkammern mit 75 cm² Bodenfläche ausgesät und mit einem Medium aus DMEM, versetzt mit 100 Mikrogramm/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin, 3 Mikroliter/ml Amphotericin und 5% FBS. Die Aussaat der Fibroblasten erfolgt in einer niedrigen

Dichte (5×10^5 Zellen), um eine möglichst große Effektivität der Transduktion zu erreichen.

Am Folgetag, wenn alle Fibroblasten Kontakt mit der Bodenfläche der Brutkammer bekommen haben und sich langsam ausbreiten, wird ein Mediumwechsel vorgenommen mit Medium aus der Psi-CRIP Zelllinie. In diesem Medium befinden sich 1,0 - 10,0 Mio Virionen/ml Medium, welche frisch aus dem Medium der Verpackungszelllinie (Psi-CRIP) abpipettiert sind. Das Medium wird hierfür zunächst durch einen Porenfilter mit einem Poren durchmesser von 0,45 Mikrometern gefiltert, um es von Zelldebris und möglichen Kontaminantien zu befreien. Anschließend wird dem Medium die Substanz Polybrene in einer Konzentration von 8 Mikrogramm/ml beigemischt.

15

Polybrene ist wie Protamin und DEAE-Dextran ein kationisches Polymer, bestehend aus 1,5-Dimethyl-1,5-Diaxadecamethylen-Polymethobromid, und entfaltet seine transfektionsunterstützende Wirkung dadurch, daß es an die Viruspartikel adsorbiert und gleichermaßen auch an die Oberfläche der Zielzelle, um so die elektrostatischen Abstoßungskräfte dieser beiden negativ geladenen Stoffe abzuschwächen. Zur Gewinnung ausreichend großer Mengen an Viruspartikeln müssen die Zellen der Psi-CRIP Zelllinie bereits konfluent sein und ein Mediumwechsel am Vortag der Transduktion stattfinden, um eine möglichst hohe Anzahl von aktiven Viren/ml Medium zu gewährleisten. Die Viren haben bei 37 Grad Celsius im Brutschrank eine durchschnittliche halbzeitliche Lebensdauer von 6-8 Stunden. Die Lebenszeit der Viren kann durch Senken der Brutschranktemperatur auf 32 Grad Celsius bis zum Zehnfachen verlängert und damit die Effektivität der Transduktion erheblich gesteigert werden.

Wenn die rekombinanten Viren im Medium mit Zielzellen zusammenkommen, wird das Virion an der Zelloberfläche der Fibroblasten durch spezielle Rezeptoren gebunden und entläßt das verpackte RNS Genom in das Zellinnere. Diese wird revers transkribiert und die entstehende DNS gelangt in den Zellnukleus, wo sie in das Genom der Zielzelle stabil integriert wird. Diese integrierte Kopie des rekombinanten viralen Vektors mit dem modifizierenden Gen wird an die Tochterzellen weitergegeben wie jedes andere autosomale Gen. Zudem erfolgt eine stabile regelmäßige Expression des Gens, so daß die Zielzellen nunmehr große Mengen des gewünschten Protein sezernieren.

Bei Verwendung adenoviraler Vektoren wird man eine nur temporäre Genexpression erwarten können, welche nach einigen Zellgenerationen wieder aus dem Zellgenom eliminiert werden wird. Das Medium sollte für 24 Stunden mit den Zielzellen zusammen belassen werden, um den Transduktionsvorgang in allen Zellen abgeschlossen zu haben.

Das virusenthaltende Medium kann auch asserviert werden, um es zu einem späteren Zeitpunkt für eine Transduktion von Fibroblasten zu verwenden. Hierzu wird das Medium abpipettiert und auf Trockeneis schockgefroren, bis es eine gelbliche Färbung annimmt. Anschließend wird das Medium bei - 80 Grad Celsius gelagert. Man muß allerdings mit einem Verlust von 30 - 50 % Viren durch diesen Vorgang rechnen.

Das Wachstum der genetisch modifizierten gegenüber den unbehandelten Fibroblasten wird untersucht durch Aussaat von jeweils 5×10^5 Zellen auf 60 mm durchmessende Petrischalen

und Auszählen des Zellen in 12 - stündigem Abstand über insgesamt 4 Tage nach dem oben genannten Verfahren. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die biologische Aktivität des sezernierten Proteins ziehen, da die verwendeten Substanzen mit 5 Ausnahme von sFLT1 D1-D6 auch autokrin mitogen wirken, also die Fibroblasten, welche selbst das Protein sezernieren, zur Zellteilung anregt. Die Anzahl der Fibroblasten wird anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels einer Zählkammer gemessen und die Vitalität der Zellen durch Evans-Blue 10 bestimmt und mit den Kontrollen, welche aus unbehandelten Fibroblasten bestehen, verglichen.

Die Proteinexpression wird außerdem in vitro mittels ELISA-Techniken bestimmt werden. Es wird dabei eine wesentlich höhere 15 Proteinproduktion durch die genetisch modifizierten Fibroblasten erwartet.

Die solchermaßen vorbereiteten Zellpopulationen werden nach Quantifizierung in Medium transportiert zur Durchführung der 20 sich daran anschließenden Operation.

Operation

Es werden 2 Untergruppen (I und II) mit jeweils 200 Tieren gebildet. Jede Untergruppe wird wiederum in 5 Subgruppen (I.I - I.V, II.I - II.V) zu jeweils 40 Tieren dividiert. Da 4 verschiedene Faktoren getestet werden sollen (VEGF 165, VEGF 165 + sFLT-1, PDGF-B und bFGF), muß jede Subgruppe wiederum in 4 Untergruppen à 10 Tieren aufgeteilt werden. Das Körpergewicht der Tiere wird während der Versuchstage regelmäßig mittels 30 einer digitalen Waage bestimmt.

In Gruppe I wird 1 Woche vor der eigentlichen Operation jeder Lappen am aetheranästhesierten Tier in einer Ausdehnung von 7 x 7 cm vorgezeichnet und bereits zu diesem Zeitpunkt die Lappenbehandlung vorgenommen.

5

Gruppe I.I erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von 10 Mio. genetisch modifizierten Fibroblasten (GMFB) in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Die Injektion selbst erfolgt mittels einer sterilen 2 ml Spritze mit 0,4 mm durchmessender Stahlkanüle in den Panniculus carnosus zwischen äußerem Faszienblatt der Bauchwand und Subcutis. Gruppe I.II erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von 10×10^6 nicht-modifizierter Fibroblasten (NMFB), aufgelöst in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Gruppe I.III erhält eine subkutane Injektion von 2 ml DMEM mit 10 % FBS ohne Zellzusatz. Gruppe I.IV erhält eine subkutane Injektion von 2 ml NaCl 0,9 % ohne Zellzusatz. Genau eine Woche später wird die chirurgische Hebung der solchermaßen vorbereiteten Lappen durchgeführt.

20

In der Gruppe II erfolgt die Lappenbehandlung am Tage der Lappenhebung. Gruppe I.V und Gruppe II.V werden wie die Gruppen I.I und II.I behandelt und dienen Langzeitexperimenten. Diese Tiergruppen werden erst nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten (jeweils 5 Tiere) und 12 Monaten (jeweils 5 Tiere) getötet.

Das chirurgische Vorgehen ist in allen Untergruppen identisch. Die Tiere werden anästhesiert durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus 0,05 mg/gm Ratte Ketamin (Ketanest 100 mg/ml; Fort Dodge Laboratories, Iowa/USA) und 0,0013 mg/gm Ratte Xylazin (Rampun 20 mg/ml; Bayer Corporati-

on, Kansas/USA). Die spontan atmenden Tiere werden vom Xyphoid bis zur Leistenregion rasiert und auf einen Operationstisch plaziert. Die Körpertemperatur wird während eines jeden Experimentes mittels eines digitalen 5 Rektalthermometer gemessen und über eine Wärmematte bei 36 - 37 Grad Celsius konstant gehalten.

In jedem Tier wird ein standartisierter epigastrischer Lappen gehoben mit den Maßen 7 x 7 cm. Zunächst wird dabei die Basis 10 des Lappens vorgeschnitten, die Femoralgefäß auf beiden Seiten aufgesucht und anschließend der Lappen inclusive Haut und Subcutis an den beiden inferioren epigastrischen Gefäßnervenbündeln vollständig gehoben, so daß die Durchblutung des Lappens allein über diese Gefäßstiele gewährleistet bleibt. Die 15 superioren epigastrischen Gefäßstiele werden durchtrennt nach Ligatur mittels 6-0 Ethilonnaht. Ebenso wird auch für jeden Lappen das linksseitige Gefäßnervenbündel unter 2 6-0 Ethilonligaturen durchtrennt, so daß der Lappen nunmehr lediglich über die rechtsseitigen Stielgefäß ernährt wird.

20 Gruppe II.I und Gruppe II.V erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von 10×10^6 genetisch modifizierten Fibroblasten (GMFB) in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Die Injektion selbst erfolgt wie schon für Gruppe I.I beschrieben. Gruppe II.II erhält im vorgezeichneten Lappenbereich eine subcutane Injektion von 10×10^6 nicht-modifizierter Fibroblasten (NMFB), aufgelöst in 2 ml DMEM mit 10 % FBS. Gruppe II.III erhält eine subkutane Injektion von 2 ml DMEM mit 10 % FBS ohne Zellzusatz. Gruppe II.IV erhält eine subkutane Injektion von 2 ml NaCl 0,9 % ohne Zellzusatz. Anschließend wird jeder Lappen wieder in sein Wundbett eingenäht. Hierzu werden zunächst 4 Ecknähte sowie 2 Nähte in der Medi-

anlinie mit einer 6-0 Ethilonnaht gesetzt und anschließend der ganze Lappen durch eine laufende 6-0 Ethilonnaht intracutan mit Versenken der Knoten eingenäht.

5 Alle Tiere erhalten postoperativ einen Halskragen (Fa. Kent Scientific), um sie vor Autokannibalismus zu schützen. Genau eine Woche nach diesem Eingriff werden die Tiere der Gruppen I.I-I.IV und II.I-II.IV ein letztes Mal operiert. Die Lappen werden auf eine in qmm planimetrisch aufgeteilten Plastikfolie nach ihrem Anteil an vitalem und nekrotischem Lappengewebe übertragen zur späteren computergesteuerten Bildanalyse. Nach anschließendem erneuten Heben der Lappen werden die Lappenpräparate abschließend in ihrer Gesamtheit mit der darunter liegenden Muskelschicht zur weiteren histologischen, 10 immunhistochemischen und m-RNS-analytischen Untersuchung entnommen. Zuletzt werden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Überdosis Ketamin getötet.

15

20 6 Monate bzw. 12 Monate nach Zelltransplantation erfolgt in den Tieren der Gruppen I.V und II.V die histologische und immunhistochemische Evaluation der Langzeitergebnisse, um die Dauerfolgen nach einer gentechnologischen Manipulation im Gewebe näher untersuchen zu können.

25 Sämtliche Operationen finden in den von der UKL dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der gentechnischen Sicherheitsstufe 1 statt.

Histologie, Immunhistochemie und Gewebeextraktion

30

Die histologische Aufarbeitung der Präparate erfolgt nach Fixation in Formaldehyd und Färbung in Hämatoxylin/Eosin. Die

Präparate werden zuvor in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotommesser in 5 Mikrometer dünne Schichten geschnitten, in Präparateplatten fixiert und einer entsprechenden Färbung unterzogen. Eine Färbung der Präparate erfolgt getrennt nach 5 Hämotoxylin/Eosin als primäre und Gegenfärbung in der Immunhistochemie.

10 weitere Tiere aus den Gruppen I und II, deren Lappengewebe mit GMFB behandelt wurde, werden nach 6 bzw. 12 Monaten 10 sakrifiziert und das noch verbliebene angiogenetisch veränderte Gewebe einer histologischen Untersuchung unterzogen.

15 Immunhistochemisch wird eine Färbung mittels Immunperoxidase für Faktor VIII (von Willebrand Faktor) mit Antiserum von Kaninchen zur Anfärbung von Endothelzellen sowie eine Chlorazetatesterasefärbung zur Darstellung polymorphonukleärer Zellen durchgeführt. Zusätzlich wird eine Färbung zum Nachweis des sezernierten Proteins im Lappengewebe vorgenommen.

20 Das frisch entnommene Gewebe wird auf seine Produktionsfähigkeit von produziertem Protein mittels m-RNA-Analyse durch quantitative PCR-Analyse untersucht, um einen Anhalt über die Menge und Dauer der Proteinproduktion durch die GMFB zu bekommen.

25

Die Produktion autologer Zellen zur Retransplantation in demselben Spenderorganismus geschieht nach exakt den gleichen methodologischen Vorgaben, wie sie zuvor geschildert wurden.

30

Literaturverzeichnis

1. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the rat epigastric island flap

5 Machens HG, Morgan JR, Berthiaume F, Stefanovich P and Berger A

in: Biological matrices and tissue reconstruction (Ed.: Stark, Horch, Tanczos) pp. 53-59 Springer Verlag/Berlin Heidelberg New York (1997) ISBN 3-54063863-6

10

2. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the rat epigastric island flap

Machens HG, Morgan JR, Berthiaume F, Stefanovich P, Reimer R and Berger A

15 Langenbeck's Arch Surg 383: 345-350 (1998)

3. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the 3 x 6 cm rat epigastric island flap.

Machens HG, Morgan J, Weich HE, Berthiaume F, Stefanovich P, Berger A

Eur J Plast Surg 22: 203-209 (1999)

4. Genetically modified fibroblasts induce angiogenesis in the 3 x 6 cm rat epigastric island flap - authors' reply.

25 Machens HG, Morgan J, Weich HE, Berthiaume F, Stefanovich P, Berger A

Eur J Plast Surg 22: 211-212 (1999)

30 5. Gentherapeutische Techniken und Anwendungsmöglichkeiten in der Plastischen Chirurgie

Machens HG, Morgan JR, Mailänder P
Focus MUL 17: 3-10 (2000)

6. Gentherapeutische Möglichkeiten in der Plastischen Chirurgie

Machens HG, Morgan JR, Sachse C, Berger A, Mailänder P
Chirurg 70: 176-181 (2000)

Patentansprüche

1. Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese, das isogene oder autologe Körperzellen umfaßt, die mindestens 5 ein angiogenetisches oder antiangiogenetisches Protein exprimieren.
2. Mittel nach Anspruch 1, wobei das mindestens eine angiogenetische Protein unter PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGF β (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewählt ist.
- 15 3. Mittel nach Anspruch 1, wobei das mindestens eine antiangiogenetische Protein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für VEGFR1 und VEGFR2 ausgewählt ist.
- 20 4. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem
 - a) in einem Körper durch Implantation von biologisch iner-tem Material die Bildung von isogenen oder autologen Zellen ausgelöst wird,
 - 25 b) die in Schritt a) gebildeten Zellen aus dem Körper ge-wonnen werden,
 - c) die in Schritt b) gewonnenen Zellen gentechnisch so ver-ändert werden, daß sie im Falle einer gewünschten Induktion einer Angiogenese mindestens ein angiogenetisches Protein o-der im Falle einer gewünschten Inhibition einer Angiogenese 30 mindestens ein antiangiogenetisches Protein exprimieren.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter PDGF-A (platelet derived growth factor A), PDGF-B (platelet derived growth factor B), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGF β (tumor growth factor beta), Angiopoetin 1 und Angiopoetin ausgewähltes angiogenetisches Protein exprimieren.

10 6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt c) gewonnenen Zellen ein unter VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), Angiostatin, Endostatin sowie Rezeptorenblockern für VEGFR1 und VEGFR2 ausgewähltes antiangiogenetisches Protein exprimieren.

15 7. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6 hergestellten Mittels zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese.

20 8. Verwendung nach Anspruch 7, bei der ein Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6 hergestelltes Mittel in isogenes oder autologes Gewebe des Körpers eingeführt wird, in dem eine Angiogenese induziert oder inhibiert werden soll.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/01766A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MACHENS H-G ET AL: "GENETICALLY MODIFIED FIBROBLASTS INDUCE ANGIOGENESIS IN THE RAT EPIGASTRIC ISLAND FLAP" LANGENBECK'S ARCHIVES OF SURGERY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 383, 1998, pages 345-350, XP000979127 ISSN: 1435-2443 cited in the application the whole document	1,2,7,8
Y	----- -/-	3

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2003

Date of mailing of the international search report

02/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG., A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/01766

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JKOI TATSUHIRO ET AL: "Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 19, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 35-39, XP002244221 ISSN: 1087-0156 page 37, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1; figure 2</p>	3
P,X	<p>MACHENS HANS-GUENTHER ET AL: "Platelet-derived growth factor-AA-mediated functional angiogenesis in the rat epigastric island flap after genetic modification of fibroblasts is ischemia dependent." SURGERY (ST LOUIS), vol. 131, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 393-400, XP008018381 April, 2002 ISSN: 0039-6060 the whole document</p>	1,2,7,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/01766

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **4 - 6**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplementary sheets PCT/ISA / 210

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplementary sheets PCT/ISA / 210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I, 1

Although Claims 7 and 8 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Claims 4-6:

PCT Rule 39.1(iv) – Method for treatment of the human or animal body by therapy.

Continuation of Box I, 2

Claim 1 concerns an agent for inducing or inhibiting angiogenesis containing at least one protein, said protein being characterized by a desirable property or characteristic, namely that the protein should have an angiogenic or anti-angiogenic effect. Therefore the claim includes all proteins displaying this property or characteristic, whereas the application provides support by the description within the meaning of PCT Article 5 only for a limited number of such products, etc. In the present case, the claim lacks the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. Aside from this, the claim also lacks the requisite clarity (PCT Article 6) since it attempts to define the product by the desired result. This lack of clarity is also such that it renders a meaningful search over the entire scope of protection sought impossible. Therefore the search was directed to the parts of the claim which appear clear, supported or disclosed in the above sense, namely the parts concerning the products containing the angiogenic proteins PDGF-A, PDGF-B, VEGF, bFGF, TGF β , angiopoietin 1 or angiopoietin (see page 4, paragraph 3, of the description and Claim 2), and the products containing the anti-angiogenic proteins VEGFR-1, angiostatin or endostatin (see page 4, final paragraph, to page 5, first paragraph, of the description and Claim 3).

The current Claim 4 concerns a method in which step (c) is defined by a desirable property or characteristic, namely that the cells obtained in step (b) are genetically modified such that, if the induction of angiogenesis is

desired, at least one angiogenic protein is expressed or, if the inhibition of angiogenesis is desired, at least one anti-angiogenic protein is expressed.

Therefore the claim includes all modifications to the cells which lead to expression of the angiogenic or anti-angiogenic protein, whereas the application provides support by the description in the sense of PCT Article 5 only for a limited number of such methods. In the present case, the claim lacks the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought. Aside from this, the claim also lacks the requisite clarity (PCT Article 6) since it attempts to define the method by the desired result. This lack of clarity is also such that it renders a meaningful search over the entire scope of protection sought impossible. Therefore the search was directed to the parts of the claim which appear clear, supported or disclosed in the above sense, namely the parts concerning the method in which the genetic modifications mentioned in step (c) consist of the transformation of the cell with angiogenic proteins such as PDGF-A, PDGF-B, bFGF, angiopoietin 1 or angiopoietin or of the transformation with anti-angiogenic proteins such as VEGFR-1, angiostatin or endostatin (see pages 4-5 of the description and Claims 6 and 7).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 03/01766

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MACHENS H-G ET AL: "GENETICALLY MODIFIED FIBROBLASTS INDUCE ANGIOGENESIS IN THE RAT EPIGASTRIC ISLAND FLAP" LANGENBECK'S ARCHIVES OF SURGERY, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 383, 1998, Seiten 345-350, XP000979127 ISSN: 1435-2443 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1, 2, 7, 8
Y	-----	3

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

13. Juni 2003

02/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

ALCONADA RODRIG., A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/01766

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JOKI TATSUHIRO ET AL: "Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy." NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 19, Nr. 1, Januar 2001 (2001-01), Seiten 35-39, XP002244221 ISSN: 1087-0156 Seite 37, linke Spalte, letzter Absatz -rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 2 -----	3
P,X	MACHENS HANS-GUENTHER ET AL: "Platelet-derived growth factor-AA-mediated functional angiogenesis in the rat epigastric island flap after genetic modification of fibroblasts is ischemia dependent." SURGERY (ST LOUIS), Bd. 131, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 393-400, XP008018381 April, 2002 ISSN: 0039-6060 das ganze Dokument -----	1,2,7,8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/01766

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. 4-6
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 7 und 8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Ansprüche Nr.: 4-6

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur chirurgischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

Fortsetzung von Feld I.2

Patentanspruch 1 bezieht sich auf ein Mittel zur Induktion oder Inhibition einer Angiogenese, die mindestens ein Protein enthält, wobei dieses Protein durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft charakterisiert ist, nämlich, dass das Protein eine angiogenetische oder antiangiogenetische Wirkung aufweist. Der Patentanspruch umfasst daher alle Proteine, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlt dem Patentanspruch die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt dem Patentanspruch auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihm versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile des Patentanspruchs gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Produkte, die die angiogenetischen Proteine PDGF-A, PDGF-B, VEGF, bFGF, TGFbeta, Angiopoietin 1 oder Angiopoietin enthalten (siehe Seite 4, Absatz 3 der Beschreibung und Anspruch 2), sowie die Produkte, die die antiangiogenetische Proteine VEGFR-1, Angiostatin oder Endostatin enthalten (siehe Seite 4, letzter Absatz 3 bis Seite 5, erster Absatz der Beschreibung und Anspruch 3).

Der geltende Patentanspruch 4 bezieht sich auf ein Verfahren, bei dem Schritt (c) durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft definiert ist, nämlich, dass die im Schritt (b) gewonnenen Zellen gentechnisch so verändert werden, dass sie im Falle einer gewünschten Induktion einer Angiogenese mindestens ein angiogenetisches Protein oder im Falle einer gewünschten Inhibition einer Angiogenese mindestens ein antiangiogenetisches Protein exprimiert wird.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Der Patentanspruch umfasst daher alle Veränderung der Zellen, die zur Expression eines angiogenetischen oder antiangiogenetischen Proteins führen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Verfahren liefert. Im vorliegenden Fall fehlen dem Patentanspruch die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt dem Patentanspruch auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihm versucht wird, das Verfahren über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile des Patentanspruchs gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend das Verfahren wobei die im Schritt (c) erwähnten gentechnischen Veränderungen aus der Transformation der Zelle mit angiogenetischen Proteinen wie PDGF-A, PDGF-B, bFGF, Angiopoietin 1 oder Angiopoietin oder aus der Transformation mit antiangiogenetischen Proteinen wie VEGFR-1, Angiostatin oder Endostatin besteht (siehe Seite 4-5 der Beschreibung und Ansprüche 6 und 7).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.